

BEST AVAILABLE COPY

09/214982 7

PCT/JP 97/02456

日 本 国 特 許 庁

15.07.97

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年 7月15日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第185216号

出 願 人

Applicant (s):

株式会社中外分子医学研究所



PRIORITY DOCUMENT

1997年 8月22日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office



出証番号 出証特平09-3064088

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-802

【提出日】 平成 8年 7月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/18

【発明の名称】 新規な V E G F 様因子

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 平田 裕一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 根津 淳一

【特許出願人】

【郵便番号】 300-41

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代表者】 川口 勉

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規な VEGF 様因子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 に記載の DNA。

【請求項 2】 配列番号 2 に記載の DNA にハイブリダイズする DNA。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の DNA を含むベクター。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 に記載の DNA によりコードされるタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学の分野、特に、ヒトの血管形成に関わるタンパク質因子の分野に属する。

【0002】

【従来の技術】

動物の血管の内壁に存在する内皮細胞が新しい血管を作り出す現象、即ち、血管形成(angiogenesis)の過程は、特異的なシグナルの伝達により引き起こされる。このシグナル伝達には、これまで様々な因子が関与していることが報告されている。その中でも最も注目されている物質が、血管内皮細胞成長因子(vascular endothelial growth factor、以下、「VEGF」と称する。)である。VEGF は、血管内皮細胞の増殖や血管の透過性を亢進させる物質として精製、単離されたタンパク質性因子である(Senger,D.R.et al, Science,219:983-985(1983);Ferrara,N and Henzel,W.J. Biochem.Biophys.Res.Commun.,161:851-858(1989))。ヒト VEGF 遺伝子には、8つのエキソンが存在し、そのスプライシングの違いにより、121、165、189、及び206のアミノ酸からなる4種類のサブタイプが形成され、この結果、VEGFが異なる分泌パターンを示すことが報告されている(Houck,K.A.et al. Mol. Endocrinol. 5,1806-1814(1991))。また、VEGFには、特異的な受容体である flt-1が存在し、VEGFの flt

-1への結合が、シグナル伝達に重要であることが報告されている(Vries, C.D. et al. Science, 255:989-991(1992))。

【0003】

VEGFの類縁因子としては、これまでにPlGF(Placental growth factor)やPDGF(Platelet-Derived Growth Factor)が単離されており、血管内皮細胞に対し、増殖促進活性を有することが示されている(Maglione, D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9267-9271(1991); Betsholtz, C. et al. Nature 320, 695-699(1986))。さらに最近になって、VEGF-B(Olofsson, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2576-2581(1996))、及びVEGF-C(Lee, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1988-1992(1996); Joukov, V. et al. EMBO J. 15, 290-298(1996))が単離された。

【0004】

これら因子は一つのファミリーを形成していると考えられ、上記以外の未知な因子をそのメンバーとして含んでいる可能性も想起される。

【0005】

VEGFについては、発生段階における血管形成の役割ばかりでなく、糖尿病、リウマチ様関節炎、網膜症、固形腫瘍の増殖の際に認められる病的血管新生にも関与していることが示唆されている。従って、現在、VEGFファミリーは、有用な新薬開発のターゲットとして非常に注目されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なVEGFファミリー遺伝子を単離することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

最近クローニングされたVEGFファミリーの一つ、VEGF-Cとホモロジーを持った遺伝子の検索をGenBankデータベース中のEST(Expressed sequence tag)及びSTS(Sequence tagged sites)に対して行った。その結果、VEGF-CのC末端部分にホモロジーを有すると推定されるESTを見いだした。次いで、この配列を基にプライマーを設計し、5' RACE法、及び3' R

ACE法で該当するcDNAを増幅した。増幅したcDNAの塩基配列を決定し、これを基に推定アミノ酸配列を決定したところ、該アミノ酸配列は、全体に渡って、VEGF-Cのアミノ酸配列と高いホモロジーを有することが判明した。ホモロジーの高さから、単離したクローンはVEGFファミリーに属する4番目のメンバー（以下、「VEGF-D」と称する）であると考えられた。

【0008】

さらに、ヒトの様々な組織におけるVEGF-D遺伝子の発現を、ノーザンブロット法により解析したところ、該遺伝子が肺、心臓、小腸などで発現していることを見いだした。

【0009】

即ち、本発明は、VEGFファミリーに属する新規な遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：2に記載のDNA、
 - (2) 配列番号：2に記載のDNAにハイブリダイズするDNA、
 - (3) (1)又は(2)に記載のDNAを含むベクター、
 - (4) (3)に記載のベクターを保持する形質転換体、
 - (5) (1)または(2)に記載のDNAによりコードされるタンパク質、
- に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明のVEGF-Dは、VEGF-Cに対し高いホモロジーを有しており、VEGFファミリーの第4番目の因子であると考えられる。VEGFは、発生段階における血管形成を主要な機能とし、その他、糖尿病、リウマチ様関節炎、網膜症、固形腫瘍の増殖の際に認められる病的血管新生等にも関与していることが考えられており、VEGF-Dも同様の機能を担っていると考えられる。

【0011】

本発明のVEGF-Dの利用法としては、例えば、VEGF-D遺伝子をVEGF-D遺伝子欠損症患者の体内に導入したり、また体内で発現させるなどして遺伝子治療に用いることが考えられる。一方、該遺伝子のアンチセンスを用いて

、該遺伝子の自体の発現を阻害し、病的血管新生を抑制することも考えられる。

【0012】

VEGF-D遺伝子又は該遺伝子のアンチセンスを体内に導入する方法としては、種々の方法が考えられるが、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などが、好適に用いられる。

【0013】

また、これら遺伝子を体内で発現させるためには、該遺伝子を適当なベクターに組み込み、上記のレトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などによって、体内に導入する方法が考えられる。用いられるベクターには、特に制限はないが、pAdexlcwやpZIPneoなどのベクターが好適である。

【0014】

さらなる本発明の利用法としては、VEGF-Dタンパク質の血管形成作用を利用して、創傷治療や、副血行路形成促進などに応用することや、VEGF-Dタンパク質に対する抗体を作製し、病的血管新生の治療剤とすることも考えられる。

【0015】

ここで用いられるVEGF-Dタンパク質は、VEGF-D遺伝子を適当な発現ベクターに組み込み、このベクターを宿主に導入する方法によって、大量に生産することができる。用いられるベクターとしては、特に制限はないが、pGEMEX-1 (Promega社製)、pEF-BOS (Nucleic Acids. Res. 1990 18(17) p5322) などのベクターが好適に用いられる。また、ベクターの導入される宿主としては、大腸菌、CHO細胞、COS細胞などが好適に用いられる。

【0016】

形質転換体に大量発現させたVEGF-Dタンパク質は、ホモジェナイザー、超音波細胞破碎などによる可溶化处理、各種緩衝液による抽出処理、酸またはアルカリによる可溶化もしくは沈殿処理、更には有機溶媒による抽出もしくは沈殿処理、硫酸などによる塩析、透析、メンブレンフィルターなどを用いた限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマト

グラフィー、向流分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動もしくはゲル電気泳動、抗体や受容体等を固定化したアフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせることで精製を行うことが可能である。

【0017】

さらに、VEGF-Dタンパク質に対する抗体を作製する方法としては、精製後の該タンパク質をウサギや羊等に免疫してポリクローナル抗体を作製したり、マウスやラットに免疫してその抗体産生細胞からモノクローナル抗体を作製する方法等が挙げられる。得られた抗体は、直接用いることも可能であるが、免疫原性を低下させるため、ヒト型化した後に用いると有効である。ここで、抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDR graft法や、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製する方法などが挙げられる。

【0018】

得られたVEGF-Dタンパク質又はその抗体は、皮下注射などの方法により、体内に投与することが可能である。

【0019】

なお、当業者にとって、配列番号：2に記載のDNA配列を基に、ハイブリダイゼーション技術によって、類似のタンパク質をコードするDNAを単離することは、通常行いうる程度のことである。従って、VEGF-Cとハイブリダイズしない特定の条件下で、配列番号：2に記載のVEGF-DのDNAとハイブリダイズするDNA、さらには該DNAによりコードされるタンパク質も本発明の範囲に含まれる。

【0020】

【実施例】

【実施例1】 TF ASTA法によるホモロジー検索

VEGF-CのC末端側に存在する「BR3P (Balbani ring 3 protein) リピート」に見られるコンセンサス配列を基に「CGPNKELDENTCQCVC」という配列を設計し、Genbankデータベース(1996年2月29日現在)

中の全EST及びSTS配列をTFASTA法 (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448(1988)) で検索した。検索条件は以下のものを用いた (表1)。

【0021】

【表1】

Sequences:	392,210
Symbols:	135,585,305
Word Size:	2
Gap creation penalty:	12.0
Gap extension penalty:	4.0

この結果、このコンセンサス配列をコードすると考えられるEST (Accession No.H24828)を見いだした。この配列は「The WashU-Merck EST Project」によって登録されたESTの一つであり、検索に用いた16アミノ酸中9個が一致していた。この配列を基にさらにNCBIの「UniGene」による検索を行うと、同一遺伝子由来のESTと考えられる配列が、このESTを含め全部で5個 [T64149, H24780, H24633, H24828, T64277 (1996.3.1現在)] 登録されていることが判明した。このうち、T64277とT64149、H24828とH24780はそれぞれ同一クローンの5'配列と3'配列の組合せであり、そのクローンのインサートサイズはどちらも約0.9kbであった (図1)。

【0022】

H24828の配列をホモロジーの見つかったフレームでタンパク質配列に翻訳すると、C末端の104アミノ酸をコードしていることが予想された。このアミノ酸配列をVEGF-Cの配列と並べてみると104アミノ酸中28個のアミノ酸が一致しており (27%)、しかもシステインやプロリン等タンパク質の構造保持に重要なアミノ酸がよく保存されていた (図2)。

【0023】

【実施例2】 ライブラリーからのcDNAのクローニング

検索により見いだしたEST(H24828)の配列を基に5' RACE用のプライマー及び3' RACE用のプライマー(5' RACE用: 5'-AGGGATGGGGAACCTTGAACGCTGAAT-3'、3' RACE用: 5'-GATCTAATCCAGCACCCCAAAAAGTGC-3')を設計した(図1)。ヒト肺由来のポリA⁺RNAから逆転写酵素を用いて、二本鎖cDNAを合成し、さらに、その両末端にアダプターcDNAを結合させたcDNAである「Marathon-Ready cDNA, Lung (Clontech社製)」を鋳型とし、上記プライマー及びアダプタープライマーであるAP-1プライマー(5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') (図1)を用いて、PCRを行った。なお、上記アダプターcDNA内には、アダプタープライマーAP-1及びAP-2がハイブリダイズする領域が存在する。PCRは、94℃で1分の処理後、94℃で30秒、72℃で4分の処理を5サイクル、次いで、94℃で30秒、70℃で4分の処理を5サイクル、さらに、94℃で20秒、68℃で4分の処理を25サイクルの条件で行った。[ただし、Taqポリメラーゼとして、「Advantage KlenTaq Polymerase Mix」の代わりに、「TaKaRa Ex Taq」(宝酒造製)及び添付のバッファーを用いた。]この結果、5'側と3'側の、それぞれ1.5Kb、0.9Kbの断片が増幅された。これら断片を、「pCR-Direct Cloning System (Clontech社製)」、「pCR-T RAP Cloning System (GenHunter社製)」、及び「PT7Blue-T vector (Novagen社製)」を用いて、それぞれクローニングした。なお、5' RACE断片を「pCR-Direct vector」にクローニングする際には、「5'-CTGGTTCGGCCCAGAACTTGAACGCTGAATCA-3'」、及び「5'-CTCGCTCGCCCACTAATACGACTCACTATAGG-3'」をプライマーとして用い、再増幅を行った。

【0024】

【実施例3】 塩基配列の解析

「ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with Amplitaq DNA Polymerase FS」及び「377 A DNA Sequencer (ABI社製)」を用いてDNA配列を決定した。なお、プライマーには、ベクター内のプライマー(5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'、5'-CCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3')及び、AP-2プライマー(5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3')、さらに以下の10種類の配列内プライマーを用いた(表2)。

【0025】

【表2】

SQ1	5' -AAGTCTGGAGACCTGCT-3'
SQ2	5' -CAGCAGGTCTCCAGACT-3'
SQ3	5' -CGCACCCAAGGAATGGA-3'
SQ4	5' -TGACACCTGGCCATTCCA-3'
SQ5	5' -CATCAGATGGTAGTTCAT-3'
SQ6	5' -ATGCTGAGCGAGAGTCCATA-3'
SQ7	5' -CACTAGGTTTGCGGCAACTT-3'
SQ8	5' -GCTGTTGGCAAGCACTTACA-3'
SQ9	5' -GATCCATCCAGATCCCTGAA-3'
SQ10	5' -CAGATCAGGGCTGCTTCTA-3'

クローニングした5'側の約1.5kbの断片と3'側の約0.9kbの断片の塩基配列を決定したところ、その重なり部分の塩基配列が一致したことから、目的の遺伝子の5'側と3'側のcDNAが確かに得られたことが判明した。該cDNAの全塩基配列を決定したところ、この新規遺伝子は全長約2kbで、354アミノ酸から成るタンパク質をコードしうる遺伝子であった（配列番号：1及び配列番号：2）。Genbankデータベースに登録されていた各EST配列との関係を図1に示す。他のVEGFファミリーとアミノ酸配列を比較すると、ファミリータンパク質間でよく保存されているアミノ酸はこの新規遺伝子中にも保存されており、この遺伝子がVEGFファミリーに属する新規遺伝子であることが明らかとなった（図3）。なお、図3中の「HSVEGF」は、ヒトの「VEGF」を指し、「HSVEGF-D」、「HSVEGF-C」、「HSVEGF-B」は、ヒトVEGFのホモログであるヒト「VEGF-D」、ヒト「VEGF-C」、ヒト「VEGF-B」をそれぞれ指す。さらに、「HSPDGF-A」はヒトの「PDGF-A」、「HSPDGF-B」はヒトの「PDGF-B」、「HSP1GF2」はヒトの「P1GF2」をそれぞれ指す。VEGF-

Dは、中でもF1t4リガンドとしてクローニングされたVEGF-Cと高いホモロジーを示していることから、F1t4と似たレセプターに対するリガンドであると推定された。

【0026】

疎水性プロット(図4a)、及びvon Heijneの方法(von Heijne G, Nucleic Acids Res. 14, 4683-4690(1986))でシグナルペプチド切断点を予想すると(図4b)、N末端から21アミノ酸はシグナルペプチドとして切断されると考えられるが、VEGF-Cと同様にさらなるプロセッシングを受ける可能性もあると考えられる。

【0027】

【実施例4】 ノーザンブロット解析

「pCR-Direct vector」中にサブクローニングされた5'側断片より、EcoRVによって切り出される約1kbpの断片を $[\alpha-^{32}\text{P}]$ dCTPにより標識し、プローブとして用いた。標識は「Ready-to Go DNA labelling beads(Pharmacia社製)」を用いたランダムプライマー法により行った。「Multiple Tissue Northern(MTN) Blot-Human」、「Human II」、「Human Fetal」、及び「Human Cell line」(Clontech社製)を用い、「ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech社製)」中で常法に従ってハイブリダイゼーションを行った。この結果、肺、心臓、小腸で強く発現しているのが認められた。また、骨格筋、卵巣、結腸、及び脾臓でも弱く発現していた。なお、mRNAの見かけの分子量は約2.2kbであり、今回クローニングした遺伝子はほぼ全長に近いものであると考えられた。

【0028】

【発明の効果】

本発明により、VEGF-C遺伝子と高いホモロジーを有する新規な遺伝子VEGF-D遺伝子が単離された。VEGF-Dは、発生段階における正常な血管新生だけでなく、糖尿病、リウマチ様関節炎、固形腫瘍の増殖の際に認められる病的血管新生にも関与していると考えられる。本発明の遺伝子は、VEGF-D遺伝子欠損症に対する遺伝子治療に用いることが可能であり、また本発明の遺伝

子を発現させて得られるVEGF-Dタンパク質は、創傷治療、副血行路形成促進などの応用が期待される。さらにVEGF-Dタンパク質の阻害剤は、新規な抗ガン剤などとして利用されることが期待される。

【0029】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 2004

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 肺 (lung)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 403 .. 1464

特徴を決定した方法 : E

配 列

CCAGCTTTCT GTARCTGTAA GCATTGGTGG CCACACCACC TCCTTACAAA GCAACTAGAA	60
CCTGCGGCAT ACATTGGAGA GATTTTTTTTA ATTTTCTGGA CAYGAAGTAA ATTTAGAGTG	120
CTTTCYAATT TCAGGTAGAA GACATGTCCA CCTTCTGATT ATTTTGGAG AACATTTTGA	180
TTTTTTTCAT CTCTCTCTCC CCACCCCTAA GATTGTGCAA AAAAAGCGTA CCTTGCCTAA	240
TTGAAATAAT TTCATTGGAT TTTGATCAGA ACTGATCATT TGGTTTTCTG TGTGAAGTTT	300
TGAGGTTTCA AACTTTCCTT CTGGAGAATG CCTTTTGAAA CAATTTTCTC TAGCTGCCTG	360
ATGTCAACTG CTTAGTAATC AGTGGATATT GAAATATTCA AA ATG TAC AGA GAG	414

Met Tyr Arg Glu

1

TGG GTA GTG GTG AAT GTT TTC ATG ATG TTG TAC GTC CAG CTG GTG CAG	462
Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val Gln Leu Val Gln	

5	10	15	20	
GGC TCC AGT AAT GAA CAT GGA CCA GTG AAG CGA TCA TCT CAG TCC ACA	510			

Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser Ser Gln Ser Thr	
25 30 35	
TTG GAA CGA TCT GAA CAG CAG ATC AGG GCT GCT TCT AGT TTG GAG GAA	558
Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu Glu Glu	
40 45 50	
CTA CTT CGA ATT ACT CAC TCT GAG GAC TGG AAG CTG TGG AGA TGC AGG	606
Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg Cys Arg	
55 60 65	
CTG AGG CTC AAA AGT TTT ACC AGT ATG GAC TCT CGC TCA GCA TCC CAT	654
Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala Ser His	
70 75 80	
CGG TCC ACT AGG TTT GCG GCA ACT TTC TAT GAC ATT GAA ACA CTA AAA	702
Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile Glu Thr Leu Lys	
85 90 95 100	
GTT ATA GAT GAA GAA TGG CAA AGA ACT CAG TGC AGC CCT AGA GAA ACG	750
Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro Arg Glu Thr	
105 110 115	
TGC GTG GAG GTG GCC AGT GAG CTG GGG AAG AGT ACC AAC ACA TTC TTC	798
Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr Asn Thr Phe Phe	
120 125 130	
AAG CCC CCT TGT GTG AAC GTG TTC CGA TGT GGT GGC TGT TGC AAT GAA	846
Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Glu	
135 140 145	
GAG AGC CTT ATC TGT ATG AAC ACC AGC ACC TCG TAC ATT TCC AAA CAG	894
Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile Ser Lys Gln	
150 155 160	
CTC TTT GAG ATA TCA GTG CCT TTG ACA TCA GTA CCT GAA TTA GTG CCT	942
Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu Leu Val Pro	
165 170 175 180	

GTT AAA GTT GCC AAT CAT ACA GGT TGT AAG TGC TTG CCA ACA GCC CCC	990
Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr Ala Pro	
185 190 195	
CGC CAT CCA TAC TCA ATT ATC AGA AGA TCC ATC CAG ATC CCT GAA GAA	1038
Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro Glu Glu	
200 205 210	
GAT CGC TGT TCC CAT TCC AAG AAA CTC TGT CCT ATT GAC ATG CTA TGG	1086
Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met Leu Trp	
215 220 225	
GAT AGC AAC AAA TGT AAA TGT GTT TTG CAG GAG GAA AAT CCA CTT GCT	1134
Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn Pro Leu Ala	
230 235 240	
GGA ACA GAA GAC CAC TCT CAT CTC CAG GAA CCA GCT CTC TGT GGG CCA	1182
Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys Gly Pro	
245 250 255 260	
CAC ATG ATG TTT GAC GAA GAT CGT TGC GAG TGT GTC TGT AAA ACA CCA	1230
His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys Thr Pro	
265 270 275	
TGT CCC AAA GAT CTA ATC CAG CAC CCC AAA AAC TGC AGT TGC TTT GAG	1278
Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser Cys Phe Glu	
280 285 290	
TGC AAA GAA AGT CTG GAG ACC TGC TGC CAG AAG CAC AAG CTA TTT CAC	1326
Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys Leu Phe His	
295 300 305	
CCA GAC ACC TGC AGC TGT GAG GAC AGA TGC CCC TTT CAT ACC AGA CCA	1374
Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His Thr Arg Pro	
310 315 320	
TGT GCA AGT GGC AAA ACA GCA TGT GCA AAG CAT TGC CGC TTT CCA AAG	1422
Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg Phe Pro Lys	

325	330	335	340	
GAG AAA AGG GCT GCC CAG GGG CCC CAC AGC CGA AAG AAT CCT				1464
Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn Pro				
	345	350		
TGATT CAGCG TTCCAAGTTC CCCATCCCTG TCATTTTAA CAGCATGCTG CTTTGCCAAG				1524
TTGCTGTCAC TGTTTTTTTC CCAGGTGTTA AAAAAAAAAAT CCATTTTACA CAGCACCACA				1584
GTGAATCCAG ACCAACCTTC CATTACACC AGCTAAGGAG TCCCTGGTTC ATTGATGGAT				1644
GTCTTCTAGC TGCAGATGCC TCTGCGCACC AAGGAATGGA GAGGAGGGGA CCCATGTAAT				1704
CCTTTTGTTT AGTTTTGTTT TTGTTTTTTG GTGAATGAGA AAGGTGTGCT GGTCATGGAA				1764
TGGCAGGTGT CATATGACTG ATTACTCAGA GCAGATGAGG AAAACTGTAG TCTCTGAGTC				1824
CTTTGCTAAT CGCAACTCTT GTGAATTATT CTGATTCTTT TTTATGCAGA ATTTGATTCTG				1884
TATGATCAGT ACTGACTTTC TGATTACTGT CCAGCTTATA GTCTTCCAGT TTAATGAACT				1944
ACCATCTGAT GTTTCATATT TAAGTGTATT TAAAGAAAAT AAACACCATT ATTCAAGTCT				2004

配列番号 : 2

配列の長さ : 1062

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ヒト (Homo sapiens)

組織の種類 : 肺 (lung)

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 1062

特徴を決定した方法 : E

配 列

ATG TAC AGA GAG TGG GTA GTG GTG AAT GTT TTC ATG ATG TTG TAC GTC 48

160

ATT TCC AAA CAG CTC TTT GAG ATA TCA GTG CCT TTG ACA TCA GTA CCT	528
Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro	
165 170 175	
GAA TTA GTG CCT GTT AAA GTT GCC AAT CAT ACA GGT TGT AAG TGC TTG	576
Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu	
180 185 190	
CCA ACA GCC CCC CGC CAT CCA TAC TCA ATT ATC AGA AGA TCC ATC CAG	624
Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln	
195 200 205	
ATC CCT GAA GAA GAT CGC TGT TCC CAT TCC AAG AAA CTC TGT CCT ATT	672
Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile	
210 215 220	
GAC ATG CTA TGG GAT AGC AAC AAA TGT AAA TGT GTT TTG CAG GAG GAA	720
Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu	
225 230 235 240	
AAT CCA CTT GCT GGA ACA GAA GAC CAC TCT CAT CTC CAG GAA CCA GCT	768
Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala	
245 250 255	
CTC TGT GGG CCA CAC ATG ATG TTT GAC GAA GAT CGT TGC GAG TGT GTC	816
Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val	
260 265 270	
TGT AAA ACA CCA TGT CCC AAA GAT CTA ATC CAG CAC CCC AAA AAC TGC	864
Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys	
275 280 285	
AGT TGC TTT GAG TGC AAA GAA AGT CTG GAG ACC TGC TGC CAG AAG CAC	912
Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His	
290 295 300	
AAG CTA TTT CAC CCA GAC ACC TGC AGC TGT GAG GAC AGA TGC CCC TTT	960
Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe	

305	310	315	320	
CAT ACC AGA CCA TGT GCA AGT GGC AAA ACA GCA TGT GCA AAG CAT TGC				1008
His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys				
	325	330	335	
CGC TTT CCA AAG GAG AAA AGG GCT GCC CAG GGG CCC CAC AGC CGA AAG				1056
Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys				
	340	345	350	
AAT CCT				1062
Asn Pro				

【図面の簡単な説明】

【図1】

VEGF-D遺伝子、各EST配列、及びクローニングに用いたプライマーの
関係を示す図である。

【図2】

EST (H24828) とVEGF-Cとのアミノ酸配列の比較を示す図であ
る。

【図3】

VEGF-D遺伝子と、これまでに報告されたVEGFファミリーを構成する
遺伝子とのアミノ酸配列の比較を示す図である。

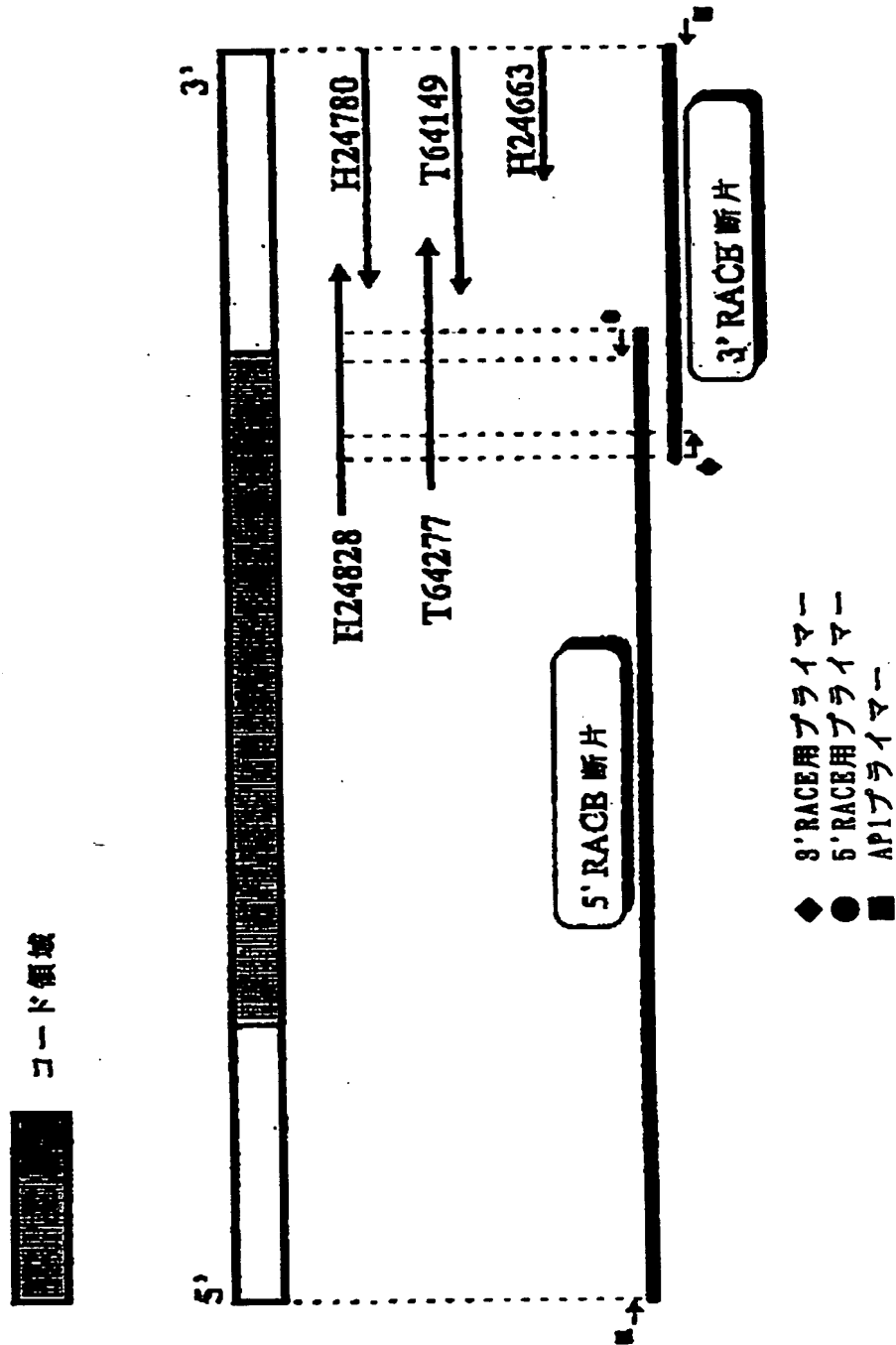
【図4】

図4 a) は、VEGF-Dの疎水性プロットを示す図である。図4 b) は、V
EGF-Dのシグナルペプチド切断点の予想を示す図である。

【書類名】

図面

【図1】



【図2】

HSVEGFCC*	10	20	30	40	50	
H24828	1	1	1	1	1	50
	1	1	1	1	1	50
HSVEGFCC	60	70	80	90	100	100
H24828	51	51	51	51	51	100
HSVEGFCC	110	120	130	140	150	150
H24828	101	101	101	101	101	150
HSVEGFCC	160	170	180	190	200	200
H24828	151	151	151	151	151	200
HSVEGFCC	210	220	230	240	250	250
H24828	201	201	201	201	201	250
HSVEGFCC	260	270	280	290	300	300
H24828	251	251	251	251	251	300
HSVEGFCC	310	320	330	340	350	350
H24828	301	301	301	301	301	350
HSVEGFCC	360	370	380	390	400	400
H24828	351	351	351	351	351	400
HSVEGFCC	410	420	430	440	450	450
H24828	401	401	401	401	401	450

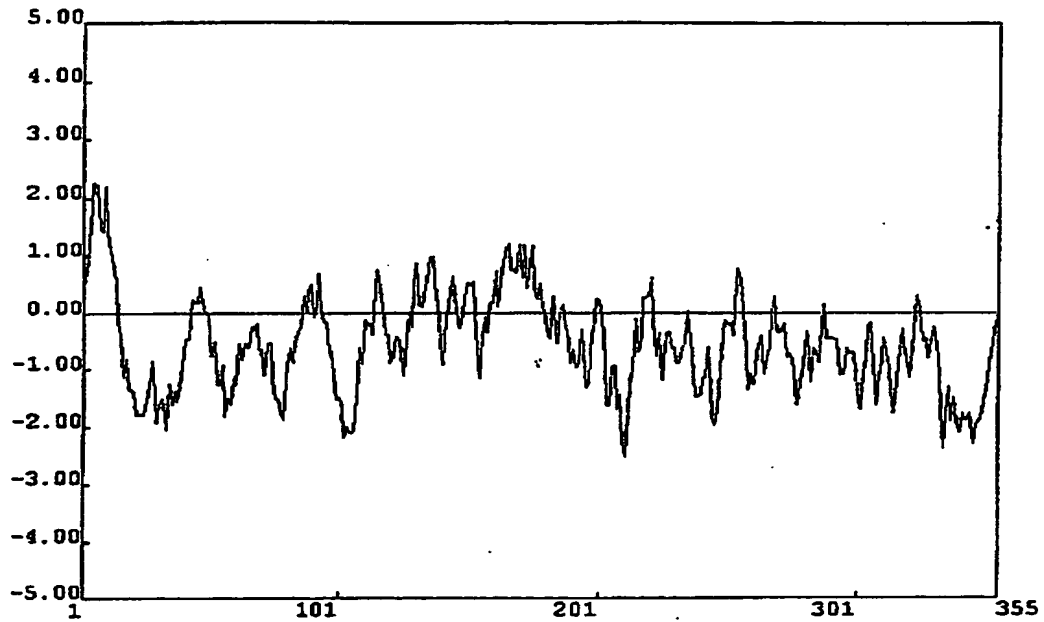
* HSVEGFCC : 2 1 VEGF-C

【図3】

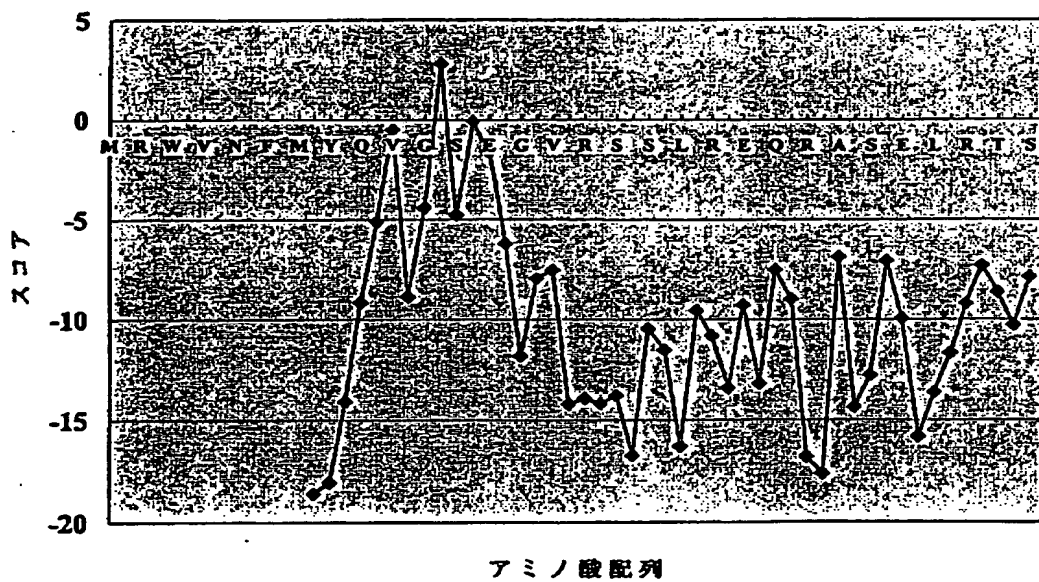
	10	20	30	40	50	
HSVEGF-D	1	MYREVVVWY	FRLYYVLVD	QSMRESPVK	-----	RSSD
HSVEGF-C	1	SHLGFYSYA	CSLLAALLP	GPKEAPAAA	AFESGLDLSQ	AEPDAGEATA
HSPOGF-A	1	ERTLACLLLL	GGYLHNVLA	EEAEIPREVI	ENLAR	-----
HSPOGF-B	1	NRGRLFLS	LCCTALVSA	ESDPPEELY	ENLSD	-----
HSP1GF2	1	SPYRLFPFQ	LOLLAALAP	AVPPQKALS	AKES	-----
HSVEGF	1	SPFLSTVHW	SLALLTLJH	AKESQAPMA	EGED	-----
HSVEGF-B	1	SPLLRR	LLAALLO	LAPADAPVQ	PDAPG	-----
	60	70	80	90	100	
HSVEGF-D	51	STLERSEGOI	RAASSLEELL	RITRSEDWQ	NRQPLKSF	TRMSRSASH
HSVEGF-C	51	YASKOLEEOL	RSYSSYDELM	TYLYPEYMN	YKGLLNGEN	QNRGQARLN
HSPOGF-A	51	IHSIRDLQRL	LEIDSASED	S-L	-----	OTSLRA
HSPOGF-B	51	IRSFDDLQRL	LNQDPGEED	AEL	-----	OLAMTR
HSP1GF2	51	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF	51	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF-B	51	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150	
HSVEGF-D	101	RST	BFA	ATFYDIELL	VDEENRTO	CSPTCTQEV
HSVEGF-C	101	SRTETAKFA	AAHYNTILL	SIQENRKTQ	QDRQVQIDV	QNEQVATNT
HSPOGF-A	101	HSHATQVYP	EGPLPIRRL	RSIEEAPAV	QKTVIYIEI	PRGSDVPTSA
HSPOGF-B	101	SRSGELES	AGGRSLSL	T(AEPAMIAE	QKTEVFEI	SRRLIDRTNA
HSP1GF2	101	-----	SEVEVP	FOEY-WQSY	QALRLQV	VSETPSEYH
HSVEGF	101	-----	MEHEVW	FQWY-TRSY	QALRLQV	FOETPDEIEY
HSVEGF-B	101	-----	HRRKVS	WIGY-TTRAT	QNEVWYPL	TYELMTYAK
	160	170	180	190	200	
HSVEGF-D	151	FE	SPQCN	VFRSSQNE	SLIQNTST	SYISQLEF
HSVEGF-C	151	FE	WYQYS	VTQSSQNS	SLIQNTST	SYLKLTFE
HSPOGF-A	151	IFL	IMPQVE	VQCTQENT	SSYQDSAY	HSESVKAVK
HSPOGF-B	151	IFL	IMPQVE	VQCTQENT	SSYQDSAY	HSESVKAVK
HSP1GF2	151	FE	SPQCN	LLRQCCGO	ELRLVYVET	ANYTMQLLK
HSVEGF	151	FE	SPQCN	LLRQCCGO	ELRLVYVET	ANYTMQLLK
HSVEGF-B	151	GL	VPSCIT	VQSSQCPD	QGLQVYVQ	NRVQKILN
	210	220	230	240	250	
HSVEGF-D	201	LVPVRYANT	GGCLPT-A	PRPYSIIR	SIQIPEEDC	SHGULCPID
HSVEGF-C	201	PATISFAMT	SGGSKLQW	YGVHSIIR	S-LPATLPC	QANSTQTN
HSPOGF-A	201	EYQVLEEL	SGGATLSL	PQYREEDTQ	P-RESQKQK	S-SRLQTL
HSPOGF-B	201	KATVLEEL	AGCET-VAA	ARPYTRSPQ	S-GEQAK	-----
HSP1GF2	201	YVLTFSQV	RQEDP	LRQKQPER	R-PKQKQK	R-EDQRT
HSVEGF	201	IGESFLQW	KQEDP	KQD	RQKQKQK	R-EDQRT
HSVEGF-B	201	LEMSLEES	QEDPQKQD	SA	-----	-----
	260	270	280	290	300	
HSVEGF-D	251	MLDSQKQK	VLDQK-LPLA	GTEDSHLOE	-----	-----
HSVEGF-C	251	YQNBELQK	LQEDPQK	DQKQSTQK	HDICSPQEL	DEETQGVCR
HSPOGF-A	251	-----	-----	-----	-----	-----
HSPOGF-B	251	-----	-----	-----	-----	-----
HSP1GF2	251	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF	251	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF-B	251	-----	-----	-----	-----	-----
	310	320	330	340	350	
HSVEGF-D	301	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF-C	301	AGLRPASQK	QKELQNSQ	QVQKQFPS	QDQVREFDE	NTQGVQKRL
HSPOGF-A	301	-----	-----	-----	-----	-----
HSPOGF-B	301	VRVYQKQK	QKQKQKQK	TALQETQK	-----	-----
HSP1GF2	301	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF	301	N-TQKQK	QKQKQKQK	QKQKQK	-----	-----
HSVEGF-B	301	BRFLQKQK	QKQKQKQK	QKQKQK	-----	-----
	360	370	380	390	400	
HSVEGF-D	351	QKQKQKQK	DTQKQK	-----	-----	-----
HSVEGF-C	351	QKQKQKQK	DTQKQK	-----	-----	-----
HSPOGF-A	351	-----	-----	-----	-----	-----
HSPOGF-B	351	-----	-----	-----	-----	-----
HSP1GF2	351	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF	351	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF-B	351	-----	-----	-----	-----	-----
	410	420	430	440	450	
HSVEGF-D	401	AKQKQKQK	RAQKQKQK	-----	-----	-----
HSVEGF-C	401	EPQKQKQK	QKQKQKQK	-----	-----	-----
HSPOGF-A	401	-----	-----	-----	-----	-----
HSPOGF-B	401	-----	-----	-----	-----	-----
HSP1GF2	401	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF	401	-----	-----	-----	-----	-----
HSVEGF-B	401	-----	-----	-----	-----	-----

【図4】

a) 疎水性



b) ヒトVEGF-Dのシグナルペプチドの予測



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なVEGFファミリー遺伝子を単離することを課題とする。

【解決手段】 VEGFファミリーの一つ、VEGF-CのC末端部分にホモロジーを有すると推定されるESTの配列を基にプライマーを設計し、PCR法により、cDNAを増幅した。増幅されたcDNAの塩基配列を決定し、これを基にアミノ酸配列を推定したところ、該アミノ酸配列は、全体に渡って、VEGF-Cのアミノ酸配列と高いホモロジーを有することが判明した。さらに、ヒトの様々な組織におけるVEGF-D遺伝子の発現を、ノーザンブロッティング法により解析したところ、該遺伝子は、肺、心臓、小腸などで発現していた。

【選択図】 図3

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井153番地2

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日
[変更理由] 新規登録
住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名 株式会社中外分子医学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)